

PCTORGANISATION MONDIALE
Bure:

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12N 15/11, C12Q 1/68, A61K 31/70, C07H 21/00	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 96/04374 (43) Date de publication internationale: 15 février 1996 (15.02.96)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR95/01036 (22) Date de dépôt international: 1er août 1995 (01.08.95) (30) Données relatives à la priorité: 94/09578 2 août 1994 (02.08.94) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (ISERM) [FR/FR]; 101, rue de Tolbiac, F-75013 Paris (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): TOULME, Jean-Jacques [FR/FR]; Château de Lestonnat, F-33170 Gradignan (FR). MISHRA, Rakesh [IN/FR]; 66, rue Camena-d'Almeda, F-33000 Bordeaux (FR). (74) Mandataire: AHNER, Francis; Cabinet Regimbeau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR).		(81) Etats désignés: CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i>
(54) Title: OLIGONUCLEOTIDE RECOGNISING A NON LINEAR NUCLEIC ACID SEQUENCE, THERAPEUTIC APPLICATIONS THEREOF AND METHOD FOR PREPARING SAME (54) Titre: OLIGONUCLEOTIDE RECONNAISSANT UNE SEQUENCE D'ACIDE NUCLEIQUE A STRUCTURE NON LINEAIRE, APPLICATION A DES FINS THERAPEUTIQUES ET PROCEDE DE PREPARATION (57) Abstract <p>An oligonucleotide designated as "Aptastruc" is disclosed, characterized in that it has an affinity for a non-linear DNA or RNA target nucleic acid sequence, and, particularly, that it is at least partially composed of a nucleic base sequence that prevents a canonical interaction with the target sequence from taking place and forms a complex with said target sequence.</p> (57) Abrégé <p>La présente invention a pour objet un oligonucléotide dit Aptastruc caractérisé en ce qu'il présente une affinité pour une séquence cible d'acide nucléique ADN ou ARN à structure non linéaire. En particulier, il est constitué au moins en partie, d'une séquence de bases nucléiques qui ne permet pas une interaction canonique avec la séquence cible et il forme un complexe avec ladite séquence cible.</p>		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GB	Royaume-Uni	MR	Mauritanie
AU	Australie	GE	Géorgie	MW	Malawi
BB	Barbade	GN	Guinée	NE	Niger
BE	Belgique	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	HU	Hongrie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IT	Italie	PL	Pologne
BR	Brsil	JP	Japon	PT	Portugal
BY	Bélarus	KE	Kenya	RO	Roumanie
CA	Canada	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CN	Chine	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LV	Lettonie	TG	Togo
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DE	Allemagne	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
FR	France			VN	Viet Nam
GA	Gabon				

"OLIGONUCLEOTIDE RECONNAISSANT UNE SEQUENCE D'ACIDE NUCLEIQUE A
STRUCTURE NON LINEAIRE, APPLICATION A DES FINS THERAPEUTIQUES ET
PROCEDE DE PREPARATION"

La présente invention concerne des composés oligonucléotidiques, leurs applications, notamment à des fins thérapeutiques ainsi qu'un procédé de préparation.

L'association d'un oligonucléotide avec une portion d'un acide
5 nucléique cible peut bloquer un processus biologique important dans lequel cet acide nucléique, ARN ou ADN, est engagé. Cette stratégie, dite antisens, peut permettre de réguler de façon sélective l'expression de tout gène dont la séquence primaire est connue. Dans cette approche devenue classique, l'association entre les deux séquences, antisens et cible, repose
10 sur la formation de structure en double brin impliquant des paires de bases Adénine-Thymine (Uracile) et Guanine-Cytosine par le biais de liaisons hydrogènes dites de "Watson-Crick". Le succès de cette approche dépend en partie de l'accessibilité de la séquence ciblée, c'est-à-dire de sa disponibilité pour engager les liaisons hydrogènes avec la séquence
15 complémentaire. Or les acides nucléiques monocaténares, tout particulièrement les ARN, adoptent, par suite de repliements complexes, des structures secondaires ou tertiaires qui peuvent considérablement affaiblir ou même rendre inopérants les oligonucléotides antisens traditionnels, c'est-à-dire ciblés sur une séquence en simple brin. Si la
20 séquence visée par l'oligonucléotide antisens est impliquée dans de telles structures les repliements intra-moléculaires entrent en compétition avec l'association de l'oligonucléotide à sa cible.

En particulier, les ARN monocaténares, messagers, pré-messagers ou viraux peuvent adopter, dans des conditions d'environnement défini,
25 des structures repliées conduisant localement à des conformations complexes. Les épingles à cheveux et les pseudo-noeuds constituent des exemples de telles structures tridimensionnelles.

A côté de l'approche dite antisens, une autre application des oligonucléotides est fondée sur la reconnaissance ADN-protéines. Dans
30 cette approche l'oligonucléotide joue le rôle de piège à protéines, notamment des facteurs de transcription, selon des modes d'interaction ADN-protéine inconnus.

Des techniques pour sélectionner des oligonucléotides reconnaissant une structure peptidique donnée ont été développées sous divers noms : "SELEX" (1990, Science, 249, 505), "APTAMERES" (1990, Science, 250, 1104 et 1149), et "PET" (1992, TIBTECH, 10, 87).

5 Dans ces méthodes on génère par la synthèse chimique une bibliothèque très large de toutes les séquences aléatoires possibles d'ADN. Ces séquences sont criblées à travers une colonne ou un filtre lié au ligand (chromatographie d'affinité) et cette première sélection permet de retenir un certain nombre de séquences possédant la bonne affinité
10 recherchée. Ce mélange est ensuite amplifié par PCR et le cycle est recommencé. Les étapes successives de sélection et d'amplification résultent en un enrichissement exponentiel des séquences possédant la fonction recherchée, jusqu'à prédominance de la séquence possédant la plus forte affinité. Cette technique permet dans une première étape, la
15 sélection d'un ou de plusieurs fragments oligonucléotidiques qui présentent la bonne affinité vis à vis du ligand et dans une deuxième étape, ces oligonucléotides sont étudiés pour leurs propriétés biologiques (inhibition, activité enzymatique).

Le ciblage de régions d'acide nucléique à structure non linéaire par
20 un oligonucléotide ne tenant pas nécessairement compte des interactions de type Watson-Crick (approche antisens) ou Hoogsteen (approche "triple hélice"), c'est-à-dire dont la séquence n'est pas nécessairement déduite de la séquence primaire de la cible, n'a jamais été proposé.

La présente invention concerne des oligonucléotides qui ne sont
25 pas dirigés contre une séquence linéaire d'acide nucléique mais prennent en compte les structures locales non linéaires notamment les conformations tridimensionnelles de la cible.

Plus précisément, la présente invention a pour objet un oligonucléotide dit "Aptastruc", caractérisé en ce qu'il présente une
30 affinité pour une séquence cible d'acide nucléique ADN ou ARN à structure non linéaire.

On entend ici par "affinité" le fait que l'oligonucléotide Aptastruc forme un complexe stable avec la séquence cible. L'affinité pour la cible peut être déterminée par tout moyen connu :

- soit par une réduction de mobilité électrophorétique, le complexe migrant moins vite que la cible libre,

- soit par chromatographie, l'oligonucléotide Aptastruc étant retenu dans la colonne sur une phase greffée avec la structure cible,

5 - soit par spectrophotométrie d'absorption UV. La dissociation des complexes formés par les acides nucléiques s'accompagne d'une augmentation d'absorbance à 260nm. L'enregistrement de ce paramètre en fonction de la température conduit à des courbes de fusion caractérisées par un point d'inflexion à une température dite de demi-transition (Tm) lorsqu'on se trouve en présence d'un complexe.

10 Les oligonucléotides, selon la présente invention ne sont pas déduits de la séquence primaire de la cible selon les règles d'appariement Watson-Crick ou Hoogsteen, mais sont sélectionnés par affinité, au sein d'une population générée au moins en partie par synthèse aléatoire et des
15 techniques classiques d'amplification qui permettent après clonage et séquençage, d'identifier des oligonucléotides dits Aptastruc, c'est-à-dire des oligonucléotides aptes à reconnaître une structure non linéaire.

20 La présente invention concerne en effet le ciblage de régions d'acides nucléiques à structure non linéaire par des oligonucléotides reconnaissant ces régions obtenues selon un processus en deux étapes :

 a) production d'une population d'oligonucléotides de séquences au moins en partie aléatoire, et

 b) sélection par affinité au sein de cette population, des oligonucléotides aptes à reconnaître la région à structure non linéaire.

25 Les oligonucléotides Aptastrucs ainsi sélectionnés sont alors amplifiés, puis clonés et séquencés.

30 Un oligonucléotide Aptastruc, selon l'invention est donc un oligonucléotide interagissant spécifiquement avec une structure non linéaire. La façon dont il est obtenu, prend en compte les particularités tridimensionnelles de la cible sans que la séquence de l'oligonucléotide Aptastruc puisse être prédite de façon rationnelle compte tenu des connaissances actuelles sur les structures des acides nucléiques. En particulier, l'association entre l'Aptastruc et sa cible met en jeu des interactions physico-chimiques élémentaires (liaisons hydrogènes,

empilements) entre bases nucléiques, des deux partenaires. Ces complexes peuvent éventuellement faire intervenir des interactions non encore identifiées dans les structures d'acides nucléiques naturels connues à ce jour.

5 En particulier, l'oligonucléotide Aptastruc selon l'invention est caractérisé en ce qu'il comporte une séquence de bases nucléiques qui ne permet pas une interaction canonique avec la séquence cible et qu' il forme un complexe avec ladite séquence cible.

On entend ici par "interactions canoniques", les interactions mises
10 en jeu dans la formation de paires de base du type Watson-Crick ou de triplets de bases Pyrimidine. Purine. Pyrimidine ou Purine. Purine. Pyrimidine faisant intervenir des liaisons hydrogènes dites Hoogsteen.

On entend par "complexe" que l'oligonucléotide selon l'invention forme un complexe suffisamment stable avec la séquence cible pour
15 présenter notamment une mobilité électrophorétique réduite sur gel de polyacrylamide en conditions non dénaturantes lorsqu'il est mis en présence de la séquence cible.

La complexation selon la présente invention peut faire intervenir des liaisons hydrogènes intramoléculaires entre bases nucléiques
20 éventuellement très éloignées dans la séquence primaire. Ces liaisons hydrogènes peuvent être non conventionnelles, c'est-à-dire être formées entre paires de bases autres que A-T(U) ou G-C. Les structures dans lesquelles elles sont impliquées peuvent être d'un type non identifié à ce jour. Enfin, les méthodes de calcul conformationnel existantes peuvent
25 être incapables de les prédire.

L'oligonucléotide selon l'invention, peut éventuellement comporter en outre une courte séquence complémentaire de la séquence cible appelée "ancree" qui permet de favoriser l'interaction et améliorer la cinétique d'association dans le procédé de sélection selon l'invention : la
30 majeure partie de la séquence complète de l'oligonucléotide étant une séquence qui ne permet pas d'interaction canonique.

En particulier, lorsque l'on a certaines données sur la séquence cible, notamment lorsque la séquence cible, bien que comportant une structure non linéaire, comporte également un fragment simple brin à
35 structure linéaire adjacent à ladite structure non linéaire, l'oligonucléotide selon la présente invention peut comporter une

séquence complémentaire d'une partie dudit fragment simple brin linéaire de la cible et le reste de la séquence -constituant sa majeure partie, notamment au moins 70 %- est une séquence qui ne permet pas une interaction canonique avec la séquence cible.

- 5 Ainsi l'oligonucléotide forme un complexe plus stable avec la séquence cible que le complexe formé par un oligonucléotide constitué par la seule séquence complémentaire dudit fragment simple brin à structure linéaire, avec la même séquence cible.

- 10 Comme mentionné précédemment, la comparaison de la stabilité des complexes formés par les deux oligonucléotides (l'oligonucléotide Aptastruc et l'oligonucléotide complémentaire du fragment linéaire) avec la séquence cible peut être déterminée par la mesure de leur température de demi-transition.

- 15 On peut également réaliser des expériences de compétition entre les deux oligonucléotides par chromatographie ou par mobilité sur gel d'électrophorèse. Pour ce faire, on dose les quantités respectives d'oligonucléotides non retenues par la colonne de chromatographie comportant une phase greffée avec la séquence cible ou les quantités respectives d'oligonucléotides nécessaires pour ralentir la mobilité de la
- 20 séquence cible sur gel d'électrophorèse.

Lorsque la séquence cible présente une structure auto- appariée en épingle à cheveux prolongée par une région simple brin non appariée, la séquence de l'oligonucléotide Aptastruc est pour partie complémentaire de la séquence de ladite région simple brin.

- 25 On entend ici par "épingle à cheveux" une séquence comportant une boucle non auto appariée, encadrée par des fragments 5' et 3' qui sont appariés entre eux.

De façon appropriée, un oligonucléotide Aptastruc selon l'invention comporte de 15 à 50 nucléotides.

- 30 Lorsque l'oligonucléotide peut comporter une séquence complémentaire de la séquence cible, il comprend en particulier un fragment de 0 à 10 nucléotides complémentaires d'une région simple brin de la séquence cible, lequel est couplé à un fragment de 10 à 35 nucléotides non complémentaires de la séquence primaire de la séquence cible.

L'association entre l'oligonucléotide Aptastruc et la structure cible peut inhiber un processus biologique : traduction d'un ARNm, maturation d'un pré-ARN, transcription inverse d'un ARN rétroviral. Le complexe Aptastruc/structure peut empêcher :

- 5 a) la fixation d'une protéine ou d'une enzyme sur la structure ,
 b) l'interaction ou la progression d'un complexe macromoléculaire, chargé de décrypter l'information génétique portée par la cible,
 ou
 c) la transition de la structure d'une forme X vers une forme Y
10 (signal).

Si la structure cible appartient à un pathogène, l'oligonucléotide Aptastruc peut constituer un moyen de contrôler le développement de ce pathogène.

- 15 La présente invention a en particulier pour objet un oligonucléotide, caractérisé en ce que la séquence cible est une séquence à structure non linéaire d'un acide nucléique ADN ou ARN qui commande l'expression d'un gène appliqué dans une pathologie humaine ou animale, et en ce qu'il permet le blocage du développement d'un virus, d'une bactérie ou d'un parasite. Un oligonucléotide selon l'invention, constitue
20 donc un médicament, notamment anti-viral, anti-bactérien ou anti-parasitaire.

- D'un point de vue chimique, les oligonucléotides Aptastrucs peuvent être des oligonucléotides conventionnels obtenus par synthèse ou générés *in situ* par transcription de la séquence adéquate placée en aval
25 d'un promoteur approprié, ou des oligonucléotides synthétiques chimiquement modifiés notamment sur le squelette phosphodiester (liaison phosphoramidate, phosphorothioate, phosphorodithioate, methyl phosphonate), sur le sucre (2'-O-alkyl) ou sur le nucléoside en particulier d'anométrie α .

- 30 En outre, les oligonucléotides Aptastrucs peuvent être des vecteurs actifs tels que ribozymes, ou oligonucléotides conjugués à des groupements chimiques susceptibles d'induire des coupures ou des pontages sur la cible.

Pour les applications *in vivo* on utilise de préférence des oligonucléotides Aptastrucs résistants aux nucléases.

Le processus initial de production et de sélection reste inchangé :

- a) synthèse d'une population d'oligonucléotides en série phosphodiester β ,
- b) sélection par affinité pour la structure cible,
- 5 c) clonage et séquençage.

Une fois l'oligonucléotide Aptastruc identifié, il peut alors être synthétisé et utilisé en série ribo ou désoxyribo-nucléotide ou même comportant toute modification chimique susceptible de lui conférer un avantage par rapport aux oligomères conventionnels, par exemple du type
10 phosphorothioate ou 2'-O-méthyl selon des méthodes connues.

Un intérêt des oligonucléotides Aptastrucs réside donc dans le fait qu'aucune connaissance structurale préalable n'est en principe requise tant du point de vue de la séquence cible que du point de vue de l'oligonucléotide.

15 La présente invention permet la sélection d'oligodésoxynucléotides dirigés contre des motifs essentiels au développement d'un virus, notamment du virus de l'Immunodéficience Humaine. Les cibles peuvent être constituées par le site PBS (Primer Binding Site) sur lequel est réalisé l'initiation de la copie ADNc avant intégration d'une part et par un
20 élément du génome rétroviral avant encapsidation d'autre part.

D'autres éléments ARN fonctionnels peuvent être définis sur la base des données de la littérature.

On cite en particulier les exemples suivants.

1. La séquence mini-exon des trypanosomatidés

25 Chez les parasites protozoaires de la famille des trypanosomatidés tous les ARN messagers commencent par un même motif, long de 39 nucléotides, la séquence mini-exon. Cette séquence, acquise lors d'un processus de maturation particulier joue un rôle essentiel lors de l'épissage et de la traduction. Chez les leishmanies cette séquence mini-exon adopte une structure en épingle à cheveux qui affaiblit l'effet des
30 oligonucléotides antisens conventionnels, c'est-à-dire complémentaires de l'épingle ouverte. En effet, le bilan énergétique de la formation du complexe prend en compte l'énergie à fournir pour rompre les paires de bases de la tige de l'épingle. Un oligonucléotide Aptastruc reconnaissant
35 cette structure de la séquence mini-exon peut au contraire stabiliser

l'épingle. On sait que les ribosomes ont une capacité limitée pour rompre les structures secondaires, et décoder le message. En dehors de tout autre effet l'oligonucléotide Aptastruc fixé à l'épingle mini-exon peut bloquer la traduction des ARNm et donc le développement du parasite. Bien que peu de choses soient connues sur le rôle du mini-exon, il est clair que cette séquence joue un rôle clé lors de l'épissage. Selon la présente invention, un oligonucléotide Aptastruc fixé au mini-exon peut bloquer la maturation des messagers. L'ensemble de ces effets sur la production d'ARNm mûrs et sur la synthèse protéique fait donc de cette oligonucléotide Aptastruc une molécule leishmanicide.

Certaines leishmanioses sont de nature cutanées ou cutanéomuqueuses. Les lésions et les parasites sont externes, c'est-à-dire accessibles à la lumière. Une fois l'Aptastruc identifié on peut lors de la synthèse lui lier un photosensibilisateur (groupement psoralène), générant ainsi un oligonucléotide Aptastruc photoactivable qui peut être plus efficace que l'oligonucléotide Aptastruc non modifié, puisque susceptible d'inactiver définitivement la cible. Pour d'autres applications (leishmanioses viscérales, par exemple) on peut lier l'oligonucléotide Aptastruc à des agents de coupure du type complexe métallique capables de produire des coupures par différents mécanismes.

2. La séquence TAR du rétrovirus HIV

La régulation de l'expression des gènes chez le rétrovirus de l'immunodéficience humaine (VIH) est assurée notamment par la fixation d'une protéine appelée TAT sur une séquence particulière : la séquence TAR. Cette séquence est structurée sous forme d'épingle imparfaite, certaines bases de la tige n'étant pas appariées. La position des bases nucléiques de TAR interagissant avec la protéine TAT a été déterminée par mutation ponctuelle systématique. Les éléments clés pour l'interaction TAT-TAR sont connus et l'on sait qu'en certaines positions la substitution d'une base nucléique par une autre (ou sa délétion) abolissent la formation du complexe et par conséquent perturbent l'expression des gènes du rétrovirus qui dépendent de TAT. La structure TAR peut faire l'objet d'une interaction avec un oligonucléotide Aptastruc. La formation du complexe TAR-Aptastruc peut perturber la fixation de la protéine TAT et donc dérégler la synthèse des protéines virales qui dépendent de TAT. Compte tenu du rôle joué par TAT, l'oligonucléotide Aptastruc anti-TAR peut donc constituer une molécule anti-HIV. D'autres structures

secondaires ont été identifiées dans le génome de HIV, en particulier dans la région d'initiation de la transcription inverse (PBS). Sous certaines conditions, la transcriptase inverse peut être arrêtée par fixation d'un oligonucléotide. Un oligonucléotide Aptastruc anti-structure PBS peut
5 donc agir comme inhibiteur de la transcriptase inverse.

3. L'élément IRE

Si la plupart des éléments de régulation de l'expression des gènes se trouvent au niveau de la transcription, des éléments intervenant au niveau de la traduction commencent à être identifiés. Ces motifs, situés soit
10 en amont soit en aval de la séquence codante, agissent au niveau de la traductibilité ou de la stabilité de l'ARN messenger qui les contient. Ainsi le motif IRE (Iron Responsive Element) est une séquence qui intervient dans le contrôle de l'expression des gènes de la ferritine et de la transferrine. On peut replier cette séquence IRE sous forme d'une épingle à cheveux.
15 Située en 5' du message de la ferritine, elle module le niveau de traduction de l'ARNm de la ferritine ; placée en 3' de l'ARNm de la transferrine, elle régule son temps de vie. On sait depuis peu que l'élément IRE est reconnu spécifiquement par un facteur protéique. La fixation d'une protéine sur l'élément IRE en absence de fer bloque la traduction de la ferritine et
20 protège l'ARNm de la transferrine. En présence de fer, le facteur protéique se dissocie de l'élément IRE entraînant la synthèse de ferritine et la dégradation de l'ARNm de la transferrine. On peut donc sélectionner un oligonucléotide Aptastruc contre l'élément IRE. Le complexe Aptastruc-IRE perturbe la fixation du facteur protéique et, probablement, la
25 régulation des messages correspondants. Certains désordres métaboliques du fer pourraient trouver leur origine dans des éléments IRE défectueux. Dans ce cas on peut cibler ces IRE mutants par un oligonucléotides Aptastruc et réintroduire un gène fonctionnel par thérapie génique.

L'oligonucléotide Aptastruc et le gène sauvage peuvent d'ailleurs
30 être suppléés au cours de la même opération : une fois la séquence aptastruc identifiée, on peut réaliser une construction plaçant cet aptastruc en aval d'un promoteur adéquat, conduisant, après transfection, à la production *in situ* d'un oligoribonucléotide Aptastruc.

La présente invention a également pour objet un procédé de
35 sélection *in vitro* d'un oligonucléotide Aptastruc, caractérisé en ce que :

a) on prépare une population d'oligonucléotides candidats de séquences aléatoires,

b) on met cette population d'oligonucléotides candidats en présence de la séquence cible, les candidats étant en excès, de préférence large excès, par rapport à la séquence cible,

c) on isole les oligonucléotides qui forment un complexe stable avec la séquence cible,

d) on amplifie les échantillons d'acides nucléiques isolés à l'étape c),

e) on réitère plusieurs fois les étapes b) et c), en particulier on réitère de 1 à 30 fois lesdites étapes.

Une population d'oligonucléotides de séquences aléatoires est synthétisée au hasard par introduction simultanée des quatre nucléotides pour chaque position.

Le mélange de candidats est mis en présence de la séquence cible dans des conditions qui imposent une compétition entre oligonucléotides pour l'association à celle-ci. Les complexes stables formés peuvent être isolés par chromatographie d'affinité, par électrophorèse en conditions non dénaturantes ou encore par rétention sur filtre de nitro-cellulose. La séquence cible alors éliminée et les candidats sélectionnés au cours d'un premier cycle peuvent être amplifiés par polymérisation en chaîne (PCR) à l'aide de Taq polymérase commerciale. Une seconde génération de candidats est alors à son tour soumise au même processus de sélection-amplification selon les mêmes conditions. Cette opération peut être répétée x fois ($1 < x < 30$). L'enrichissement de la population est périodiquement évalué notamment en terme d'affinité moyenne pour la cible, déterminée de façon relative notamment par mobilité retardée sur gel d'électrophorèse. A la suite de ces x cycles de sélection, les candidats sont clonés dans un vecteur approprié, d'origine commerciale et propagés dans des bactéries compétentes. Une fois les plasmides purifiés, les inserts seront séquencés.

Dans un mode de réalisation particulier le procédé selon l'invention comporte les étapes suivantes :

a) on prépare une population d'oligonucléotides candidats présentant de 5' en 3' :

- une séquence correspondant à un premier site de restriction ;

- un premier fragment de séquences complémentaires d'une partie d'un fragment simple brin à structure linéaire de la séquence cible ;
 - un second fragment de séquences aléatoires, et
- 5 - une séquence correspondant à un deuxième site de restriction.
- b) on met cette population d'oligonucléotides candidats en présence de la séquence cible, et d'un oligonucléotide dit sélecteur, ledit oligonucléotide sélecteur étant complémentaire à une partie dudit premier fragment, et les oligonucléotides candidats et sélecteurs étant en excès par
- 10 rapport à la séquence cible,
- c) on soumet l'échantillon d'acides nucléiques obtenus à l'étape b) à une étape de digestion par une enzyme ayant pour substrat le complexe d'hybridation formé par l'oligonucléotide sélecteur et la partie dudit premier brin dont il est complémentaire, de sorte que les candidats ayant
- 15 une affinité pour la séquence cible restent intacts et les autres après association au sélecteur sont coupés,
- d) on ajoute des amorces 1 et 2 complémentaires respectivement des extrémités 3' et 5' des oligonucléotides candidats, lesdites extrémités correspondant auxdits premier et deuxième sites de restriction,
- 20 e) on effectue une amplification enzymatique de l'ADN de l'échantillon,
- f) on réitère éventuellement les étapes b) à e) plusieurs fois, notamment de 1 à 30 fois, et
- g) on isole un oligonucléotide parmi ceux obtenus à l'étape f). On
- 25 peut identifier l'oligonucléotide par clonage et séquençage.

 Ce procédé présente l'avantage d'éviter une étape d'isolation par séparation des oligonucléotides obtenus après chaque cycle de sélection/amplification des étapes b) à e).

30

 D'autres caractéristiques et avantages de la présente invention apparaîtront à la lumière de l'exemple détaillé de réalisation qui va suivre, relatif à la reconnaissance d'une épingle à cheveux Py-Pu.

La figure 1 représente les séquences du fragment d'acide nucléique cible, des oligonucléotides candidats, de l'oligonucléotide sélecteur, des amorces 1 et 2 et de 3 oligonucléotides aptastrucs C₁, C₂ et C₃ décrits dans l'exemple qui suit. Le site de liaison du sélecteur sur les
5 oligonucléotides candidats est surligné et le site de fixation des candidats sur la cible est souligné. Le site SacI utilisé pour la sélection est encadré. La région variable des candidats est indiquée par ...NNN... où N est A, C, G ou T.

La figure 2 décrit le schéma du procédé de sélection -
10 amplification.

La figure 3 représente un schéma hypothétique d'une possible structure double épingle à cheveux résultant de la formation d'un complexe entre une séquence cible en épingle à cheveux et un oligonucléotide Aptastruc selon la présente invention.

La figure 4 représente un gel d'analyse par électrophorèse d'oligonucléotides candidats en absence de la séquence cible (voir 1 à 3) ou en présence de la séquence cible en épingle à cheveux (voir 4 à 6).
15

La figure 5 représente des courbes de fusion de séquence cible en épingle à cheveux en l'absence (O) ou en présence de l'oligonucléotide Aptastruc C₃ (•). Les concentrations en oligonucléotides étaient de 0,7 µM dans un tampon Tris50 mM, HCl, pH 6 et 10 mM MgCl₂. L'absorbance UV a été enregistrée à 260 nm en fonction de la température à partir de 15°C.
20

EXEMPLE I

On a appliqué le procédé de sélection selon la présente invention à
25 une séquence cible longue d'une cinquantaine de nucléotides. Cette séquence est susceptible de se replier pour donner naissance à une épingle comportant :

- a) une boucle de 8 nucléotides et,
- b) une tige formée de 13 paires de bases appariées.

Cette tige comporte sur la branche amont (5') une suite de 10 purines (Pu) et bien sûr, la branche aval (3') comprend 10 pyrimidines (Py). En outre, une série de six purines est située dans une partie en simple brin à la base de la tige. Cette région simple brin est proche de l'extrémité 5' de l'oligonucléotide. Les six purines précèdent
30 immédiatement la branche amont. On a donc une succession de 16 purines dont les 10 dernières sont appariées par liaisons hydrogènes classiques
35

(Watson-Crick). Les candidats longs de 45 nucléotides, comportent donc une partie fixe du côté 5' comprenant un site de fixation pour l'amorce utilisée en PCR, un site de restriction pour l'enzyme Sac I, et dix pyrimidines dont la séquence est en partie complémentaire de six purines en simple brin. Cette partie fixe 5' est suivie d'une région de composition aléatoire de 16 bases puis d'une partie fixe en 3' comprenant le site de fixation pour la deuxième amorce PCR (Fig 1). La sélection des candidats, décrite dans la figure 2, implique un oligonucléotide sélecteur. L'association d'un candidat et du sélecteur conduit à la formation d'un site de restriction. Ce site de restriction est placé de telle façon que les candidats fixés sur la structure cible ne peuvent s'associer au sélecteur et sont donc protégés de l'action de Sac I. A l'issue de la sélection les candidats non associés à la cible ont donc perdu le site de fixation de l'amorce 5' et ne sont donc pas amplifiés (Fig. 2).

On démontre que la structure Py-Pu de la séquence cible peut former un complexe stable avec un oligopyrimidine long de 26 nucléotides. Cet oligopyrimidine forme, dans sa partie 5', 6 paires de bases Watson-Crick avec la région purine en simple brin de l'épingle Py-Pu de la séquence cible. Selon une hypothèse, la partie 3' de l'oligopyrimidine se replie pour interagir avec le double brin comportant 16 purines. L'ensemble constitue un complexe double épingle (schéma 1, Figure 3) qui peut bloquer l'alkylation chimique ou la digestion de l'épingle Py-Pu par l'enzyme Rsa I qui possède un site à proximité de la boucle.

Pour générer des oligonucléotides Aptastrucs, dans un premier temps, on produit une population d'oligodésoxyribonucléotides synthétiques conventionnels longs de 45 nucléotides composés (de 5' vers 3') :

- a) d'une séquence comportant un site de clonage et de restriction et un site de fixation de la première amorce PCR
- b) des six pyrimidines complémentaires de la séquence purine en simple brin à la base de l'épingle Py-Pu,
- c) de quatre thymines constituant la boucle dans le complexe double épingle,

d) d'une série de seize nucléotides aléatoires, un mélange des quatre synthons étant introduit systématiquement à chacune de ces seize positions, et

5 e) d'une séquence comportant sites de restriction et de clonage et le site de fixation de la seconde amorce PCR (schéma 2, Figure 3).

On dispose en outre de deux amorces 1 et 2, complémentaires respectivement des extrémités des "candidats" et d'un sélecteur. Cet oligonucléotide sélecteur forme, après fixation à la partie complémentaire des candidats, un site de restriction pour l'enzyme Sac I. Le site de fixation
10 du sélecteur est placé de telle sorte qu'il soit inaccessible lorsqu'un oligonucléotide candidat est hybridé à la structure Py-Pu.

Des candidats Aptastrucs (c'est-à-dire une population de $4^{16} = 4,29.10^9$ oligonucléotides) ont été testés sur la structure Py-Pu, en présence du sélecteur. Ce mélange est ensuite soumis à l'action de Sac I.
15 Les candidats ayant une affinité pour la structure Py-Pu restent intacts tandis que les autres, après association au sélecteur, sont coupés. Les amorces 1 et 2 sont alors ajoutées pour amplification par PCR (polymérisation en chaîne). Les candidats ayant fixé le sélecteur ne seront pas amplifiés puisque l'action de Sac I élimine la séquence de fixation de
20 l'amorce 1. Après trois cycles (sélection/amplification), les candidats sont clonés dans pUC19. Le plasmide est propagé dans *E. coli* et l'insert est séquencé.

25 1. Effet biologique des Aptastrucs sélectionnés sur l'épingle Py-Pu

On a choisi dix clones au hasard et établi la séquence des candidats sélectionnés. Ces candidats ont tous des séquences qui ne permettent pas de prévoir une interaction avec la cible via des appariements Watson-Crick ou des liaisons Hoogsteen (directs ou inverses).

30 Trois des candidats sélectionnés ont été synthétisés chimiquement et testés pour leur affinité pour l'épingle Py-Pu qui avait servi à les sélectionner. La région variable de 16 nucléotides de trois de ces candidats a été déterminée. Ces séquences : 5' TAC GAA CGT AGG CTAG, 5' ACC ATT GTG T GGGTG et 5' GAAC TAT AA CGT GG CA ne permettent pas de proposer une

structure pour les complexes faisant intervenir des interactions connues. Les oligonucléotides C₁, C₂ et C₃ de 26 nucléotides composés du motif fixe de 10 pyrimidines suivis du côté 3' de l'une des régions variables de 16 nucléotides déterminées ci-dessus ont été synthétisés (Figure 1). Leur
5 interaction avec la structure cible a été suivie par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions non dénaturantes (Figure 3) et par courbe de dénaturation thermique. Les courbes de transition de la figure 4 indiquent un hyperchromisme associé à la destruction du complexe C₃-cible par élévation de la température. Une expérience analogue a été
10 réalisée avec l'hexamère 5'CTCCCT. Aucune transition ne peut être décelée dans la région (t=35°C) où une variation d'absorbance a été détectée avec C₃, indiquant que dans ce dernier cas l'hyperchromisme observé n'est pas dû à la seule rupture des six paires de bases Watson-Crick. Les deux méthodes électrophorèse et absorption UV, montrent que les trois
15 candidats forment des complexes avec l'épingle cible. Les oligomères C₁, C₂ et C₃ déplacent l'hexamère complémentaire de la région en simple brin à la base de l'épingle. Des expériences de compétition ont montré que les complexes entre les candidats C₁, C₂ et C₃ et la cible font intervenir des interactions plus fortes que les six paires pyrimidine-purines adjacentes à
20 la tige de l'épingle.

Les trois candidats baptisés C₁, C₂ et C₃ ont une mobilité électrophorétique ralentie, sur un gel de polyacrylamide non dénaturant, lorsqu'ils sont mis en présence de la cible Py-Pu, indiquant la formation de complexes.

25 2. Blocage d'une enzyme de restriction

Un site de restriction (Rsa I) a été placé dans la tige de l'épingle Py-Pu, à proximité immédiate de la boucle (schéma 2, Figure 3). Les trois candidats C₁, C₂ et C₃, empêchent l'action de Rsa I (Ces oligonucléotides n'ont aucun effet sur l'activité de l'enzyme sur d'autres sites).

30

3. Matériels et méthodes

3.1. Oligonucléotides et enzymes

Les oligodésoxynucléotides ont été synthétisés sur un synthétiseur automatisé, Millipore 7500 mettant en oeuvre la chimie de synthèse au phosphoramidite. On a préparé une population d'oligonucléotides "candidats" en introduisant dans le synthétiseur un mélange stoechiométrique des quatre synthons (A, T, G et C) à chacune des positions de la séquence. Tous les oligonucléotides ont été purifiés en une étape par HPLC sur colonne à phase inverse éluée avec un gradient d'acétonitrile 0-50 % dans un tampon d'acétate d'ammonium 100 mM pH 7. Les oligonucléotides ont été analysés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide/urée, après marquage à l'extrémité 5' avec des [32 P] γ ATP (110TBq/mmol, NEN) et la polynucléotide kinase de T4, selon les protocoles conventionnels. La polynucléotide kinase et l'enzyme de restriction SacI ont été obtenus chez Promega. La Taq polymérase a été obtenue chez Stehelin et Cie.

3.2. Analyse des hybrides

L'association entre la cible en épingle à cheveux et les candidats sélectionnés a été suivie et visualisée par électrophorèse sur gel dans des conditions non dénaturantes. La population d'oligonucléotides "candidats" marqués à l'extrémité 5' a été mélangée avec un excès de séquences cibles (en excès d'un facteur 10) dans un tampon acétate, Tris 50 mM pH 6 contenant 10 mM de $MgCl_2$. Ils ont été chargés sur un gel de polyacrylamide 15 % dans le même tampon et exposés à 12 mA pendant 16 heures à 4° C.

Les complexes d'oligonucléotides ont également été caractérisés par enregistrement des courbes de fusion suivies par absorption UV. Un mélange candidats/cibles (1/1) (0,7 μ M chacun) dans un tampon Tris 50 mM HCl pH 6 contenant 10 mM $MgCl_2$, placés dans une cellule de quartz, de trajet optique 1 cm. L'ensemble est disposé dans un portoir thermostaté piloté par un contrôleur HUBER. La température est élevée de 0,5°C par minute pendant que l'absorbance est enregistrée à 260 nm.

3.3. Sélection

Les séquences des oligonucléotides cibles, candidats et sélecteurs sont données sur la figure 1. Le mélange contenant 33 nM de cible et 16, 6 μ M de sélecteur et candidats est chauffé pendant 5 minutes à 75°C dans un tampon 50mM Tris acétate pH 6 contenant 10 mM $MgCl_2$. Le mélange
5 d'oligonucléotides est ensuite ramené à température ambiante et mis sur la glace pendant 30 minutes au moins. Après addition de 20 unités d'enzyme *SacI* les échantillons sont incubés pendant 20 heures à 21°C. Après digestion, l'ADN est mis à précipiter et redissous dans 10 μ l d' H_2O pour amplification.

10 L'ADN a été amplifié avec la Taq polymérase (0,25u) dans le tampon fournit avec l'enzyme dans 50 μ l de mélange de réaction contenant 0,4 mM de chacun des quatres NTPs et 1 μ M de chaque amorce. Après dénaturation (10 minutes à 95°C) l'enzyme est ajoutée et l'amplification est effectuée pendant 30 cycles (10 secondes à 95°C, 30 secondes réhybridation à 40°C, 30
15 secondes à 72°C). Le mélange amplifié est précipité par 60 μ l d'éthanol suivant l'addition de 15 μ l d'acétate ammonium 10 M. Le précipité est récupéré par centrifugation sur un micro-centrifugeur, puis lavé avec de l'éthanol 70 % et dissous dans de l'eau pour une deuxième étape d'amplification. Ceci est effectué dans les mêmes conditions, excepté que
20 l'on utilise alors uniquement l'amorce 1.

3.4. Clonage et séquençage

Après quatre cycles de sélection, l'ADN généré par amplification en présence des deux amorces 1 et 2, a été digéré *SacI* et *NdeI*, puis cloné dans
25 le plasmide pUC19, digéré par *SacI* et *BamHI*. *NdeI* et *BamHI* génèrent des sites compatibles pour la ligation. Des colonies blanches ont été sélectionnées, le plasmide a été isolé, les inserts séquencés en utilisant un kit basé sur la méthode de terminaison de chaînes dideoxy.

4. Résultats

30 La structure cible utilisée ici était une épingle à cheveux d'ADN représentée sur la figure 1 comportant une boucle de 8 nucléotides et une tige formée de 13 paires de bases. Cette tige est flanquée sur la branche amont 5' d'une suite de 10 bases comprenant une séquence de 6 purines adjacentes à la tige.

Les candidats longs de 45 nucléotides comprenaient de 5' à 3' :

1. Un site de liaison d'amorce 5' pour la réaction PCR et un site de restriction SacI ;
2. Six pyrimidines complémentaires de la séquence purine en simple brin à la base de l'épingle à cheveux ;
3. Quatre thymines ;
4. Seize nucléotides aléatoires, un mélange de quatre synthons étant introduit systématiquement à chacune de seize positions ;
5. Un site de liaison de l'amorce 3', contenant un site de clonage NdeI (Figure 1). La synthèse de la population de candidats a été effectuée à une échelle de 0.2 μ mole. En conséquence, on s'attend à voir apparaître $2,8 \times 10^7$ fois chacune des $4,29 \times 10^9$ séquences possibles.

4.1. Sélection d'oligonucléotides Aptastruc

La sélection des candidats oligonucléotides présentant une affinité pour la cible implique l'utilisation d'un oligonucléotide sélecteur qui après liaison à un candidat génère un site de restriction SacI. La séquence 5' GAGCTC reconnue par l'enzyme est située dans la séquence de l'oligonucléotide candidat à une telle position que l'association de la cible avec le candidat empêche la liaison du sélecteur et le clivage de la partie 5' terminale du candidat par SacI. Comme la région correspond au site de liaison d'une des amorces utilisées pour la réaction PCR, seuls les oligonucléotides candidats protégés de la digestion par SacI, c'est-à-dire, liés à la cible, sont disponibles pour l'amplification (Figure 2).

Les candidats sélectionnés par digestion SacI, sont ensuite amplifiés en deux étapes (voir Matériel et Méthode ci-dessus) pour générer une population de candidats enrichis en séquences reconnaissant la structure cible. Ce mélange est utilisé pour un deuxième cycle de sélection. Quatre cycles identiques de sélection sont effectués successivement à la fin desquels les candidats sélectionnés sont clonés dans le plasmide pUC19. L'ADN est extrait des clones recombinants et les inserts sont séquencés. Des séquences de la région de 16 bases correspondant aux fragments aléatoires de trois candidats sont données ci-dessous :

5' TAC GAA CGT AGG CTA G
5' ACC ATT GTG TGG GGT G
5' GAA CTA TAA CGT GGC A

5 4.2. Liaisons des candidats sélectionnés à la cible

Trois oligonucléotides 26 mères C₁, C₂ et C₃ des séquences identifiées ci-dessus ont été synthétisés chimiquement sur un synthétiseur automatique, et on a étudié leur faculté de se lier à la cible d'ADN (Figure 1). Ces oligonucléotides ont été conçus par liaison des séquences 16-mère
10 sélectionnées par le biais du motif conservé 5' CTCCCTTTT capable de former six paires de bases avec l'extrémité 3' de la cible. Comme montré sur la Figure 3, chacun des trois candidats donnait lieu à une bande de mobilité réduite sur gel de polyacrylamide après avoir été mélangé à la séquence cible et soumis à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide
15 dans des conditions non dénaturantes. Cette mobilité réduite indique la formation d'hybrides stables candidats/cibles dans des conditions de température (4°C) et ionique (50 mM Tris, 10 mM Mg²⁺) utilisés pour ces expériences.

On a également effectué l'analyse des courbes de fusion de ces
20 complexes par absorption UV. La séquence cible seule présente une température de demi hybridation (T_m) d'environ 72°C correspondant à la structure en épingle à cheveux non repliée. En présence de l'un des candidats C₁, C₂ ou C₃, la courbe de fusion présentait encore une température de transition élevée. En outre, la variation de l'absorbance à
25 des températures inférieures, indique un comportement différent de celui observé avec la cible seule. En particulier une zone de transition large avec un point médiant autour de 30°C est observé avec C₃ indiquant la dissociation d'un complexe de coopérativité limité (Figure 5).

Les propriétés observées des complexes formés avec C₁, C₂ ou C₃
30 n'étaient pas seulement dues à la formation de six paires de bases avec la région mono brin 3' de la tige de la cible. On a effectué les expériences de compétition suivantes. Un excès de 10 fois de l'hexamère 5' CTCCCT par rapport à C₂ était nécessaire pour réduire de 50 % la quantité de complexes C₂-cible.

4.3. Effet des candidats Aptastrucs sur la traduction

L'épingle Py-Pu décrite sur la figure 1 a été utilisée pour générer une cible ARN pour les aptastrucs sélectionnés selon le processus préalablement décrit. En fait, il s'agit d'un dérivé délété des trois paires de bases CAT/GTA à proximité de la boucle. Cette épingle Py-Pa/ Δ a été insérée dans la région "polylinker" du vecteur pGEM-luc (PROMEGA), c'est-à-dire en aval du promoteur SD6 et de la séquence codant pour la luciférase. Cette construction in vitro et les messages ainsi obtenus ont été exprimés en extrait acellulaire (germes de blé). L'activité luciférase a été suivie par la luminométrie en absence et en présence d'oligonucléotides aptastrucs. Les premiers résultats montrent que le candidat C1 produit une inhibition de l'activité luciférase. Cet effet est spécifique : aucun effet de C1 n'est détecté sur l'expression de la luciférase exprimée à partir du plasmide parent pGEM-luc ne portant pas l'épingle cible de C1. En outre, il faut noter que l'effet sur pGEM-luc Py-Pu Δ est plus important que celui produit par des 26 mères susceptibles de faire un complexe double épingle via des interactions canoniques décrites dans Brossalina et Toulmé, 1993, J. Am. Chem. Soc., et démontre donc l'intérêt des oligonucléotides aptastrucs comme inhibiteur spécifique de l'expression des gènes.

20 EXEMPLE II : Sélection in vitro d'Aptstrucs anti-TAR

La séquence "TAR" du génome du VIH est le site de fixation d'une protéine virale (tat). Le couple tat-TAR constitue un élément important pour le contrôle de l'expression des gènes du rétrovirus. Un ligand qui se fixerait fortement et spécifiquement sur la séquence TAR pourrait donc bloquer la fonction assurée par la protéine tat. Le motif TAR est constitué par un élément structuré en épingle à cheveux imparfaite. Cet élément a été choisi comme cible pour des oligonucléotides sélectionnés in vitro, au sein d'une population aléatoire, selon le procédé décrit. La séquence aléatoire est longue de 15 nucléotides. Une population de $4^{15} = 1,07 \cdot 10^9$ candidats a donc été générée par synthèse chimique. Cette portion aléatoire est associée à un motif fixe de 6 nucléotides servant à ancrer les candidats sur la cible. Quatre familles de 4^{15} candidats ont été conçues et testées qui diffèrent par la séquence l'ancre, complémentaire au sens Watson-Crick, de différentes parties de l'épingle TAR. Ces familles ont

nécessité l'emploi d'oligonucléotide sélecteur et d'enzyme de sélection différents. Au terme du processus de sélection / amplification, 28 candidats ont été identifiés : 12 pour la famille I, 7 pour la famille II, 3 pour la famille III et 6 pour la famille IV. Leurs séquences sont indiquées ci-dessous. Il est remarquable que la même séquence a été sélectionnée plusieurs fois. Par exemple, les trois candidats de la famille III sont identiques. Les candidats synthétisés de façon définie se sont révélés aptes à se fixer à l'épingle TAR et à entrer en compétition avec un polypeptide dérivé de tat, se fixant sur le motif TAR.

10

Dans les séquences des 28 candidats anti-TAR ci-après, le motif de six nucléotides en italique (à droite en 3' ou à gauche en 5') correspond à l'ancre et est donc commun à tous les candidats d'une famille.

FAMILLE I

15 TCCCAGTCTTCACTGGGATGG
 TCCCAGCGCAGCCATCGACTT
 TCCCAGGTGACGGGTAAACAT
 TCCCAGGGAGGGATCTATTCC

20 TCCCAGAGTGTCATCCTGGCT
 TCCCAGTGGCCCCGAGTGTC
 TCCCAGAGGCCGCTGCAATGT
 TCCCAGAATGGTGTGCTCCG
 TCCCAGGAGTGTCATCGGGT
25 TCCCAGGATGTCATAACACCT
 TCCCAGTTTCCGAATGGCGGT
 TCCCAGTTCGTCTTGGTTCGT

FAMILLE II

 TGGGATATCCAGCTGTCCCAG
30 TGGGATATCGAGCGCTCCCAG
 TCAATGTGCCAATGCTCCCAG
 CGGACAGCGCCTTCTTCCCAG
 GTGGCAGAAGCTCTTCCCAG
 GGCAATTCGATGTCATCCCAG
35 TGGGTGGTTGGGTCTCCCAG

FAMILLE III

AGGTGCTTGGAGCCGTAACCA

AGGTGCTTGGAGCCGTAACCA

AGGTGCTTGGAGCCGTAACCA

5 FAMILLE IV

TCTAACGCCGCATCGGGGTCG

TCTAACTTTGGCGGGTCTCTC

TCTAACGGTGCGCGGGTGTCC

TCTAACGAACTTCGGTTTCA

10 TCTAACTTTGGCGGGTCTCTG

TCTAACGGGTGCCTACTCGTT

23

IDENTIFICATEUR DE SEQUENCE

(1) INFORMATIONS GENERALES :

(i) DEPOSANT:

- (A) NOM: INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA
RECHERCHE MEDICALE (INSERM)
- (B) RUE: 101 Rue de Tolbiac
- (C) VILLE: PARIS
- (D) ETAT OU PROVINCE:
- (E) PAYS: FRANCE
- (F) CODE POSTAL: 75654
- (G) TELEPHONE: 45 23 60 00
- (H) TELEFAX: 45 84 68 56

(ii) TITRE DE L'INVENTION : OLIGO APTASTRUCS

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES :

(iv) FORME DECHIFFRABLE PAR ORDINATEUR :

- (A) TYPE DE SUPPORT : DISQUETTE
- (B) ORDINATEUR : MAC INTOSH
- (C) SYSTEME D'EXPLOITATION : MAC OS - SYSTEME 7
- (D) LOGICIEL : WORD PERFECT VERSION 2.0.

(v) DATE DE LA DEMANDE ACTUELLE :

- (A) NUMERO DE LA DEMANDE :
- (B) DATE DU DEPOT :

(vi) DATE DE LA DEMANDE ANTERIEURE :

- (A) NUMERO DE LA DEMANDE :
- (B) DATE DE DEPOT :
- (C) CLASSIFICATION :

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID N° : 1 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

- (A) LONGUEUR : 21 nucléotides
- (B) TYPE : ADN
- (C) NOMBRE DE BRINS : 1

(ii) ANTI-SENS : OUI

(iii) CARACTERISTIQUE : LIAISON AU GENE TAR DU VIH

(iv) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID N° : 1 :

TCCCAGTCTTCACTGGGATGG

- (3) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID N° : 2 :
- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :
 - (A) LONGUEUR : 21 nucléotides
 - (B) TYPE : ADN
 - (C) NOMBRE DE BRINS : 1
 - (ii) ANTI-SENS : OUI
 - (iii) CARACTERISTIQUE : LIAISON AU GENE TAR DU VIH
 - (iv) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID N° : 2 :
TCCCAGCGCAGCCATCGACTT
- (4) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID N° : 3 :
- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :
 - (A) LONGUEUR : 21 nucléotides
 - (B) TYPE : ADN
 - (C) NOMBRE DE BRINS : 1
 - (ii) ANTI-SENS : OUI
 - (iii) CARACTERISTIQUE : LIAISON AU GENE TAR DU VIH
 - (iv) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID N° : 3 :
TCCCAGGTGACGGGTTAACAT
- (5) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID N° : 4 :
- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :
 - (A) LONGUEUR : 21 nucléotides
 - (B) TYPE : ADN
 - (C) NOMBRE DE BRINS : 1
 - (ii) ANTI-SENS : OUI
 - (iii) CARACTERISTIQUE : LIAISON AU GENE TAR DU VIH
 - (iv) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID N° : 4 :
TCCCAGGGAGGGATCTATTCC
- (6) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID N° : 5 :
- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :
 - (A) LONGUEUR : 21 nucléotides
 - (B) TYPE : ADN
 - (C) NOMBRE DE BRINS : 1
 - (ii) ANTI-SENS : OUI

(iii) CARACTERISTIQUE : LIAISON AU GENE TAR DU VIH

(iv) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID N° : 5 :

TCCCAGAGTGCATCCTGGCT

(7) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID N° : 6 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

(A) LONGUEUR : 21 nucléotides

(B) TYPE : ADN

(C) NOMBRE DE BRINS : 1

(ii) ANTI-SENS : OUI

(iii) CARACTERISTIQUE : LIAISON AU GENE TAR DU VIH

(iv) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID N° : 6 :

TCCCAGTGGCCCCGAGTGTC

(8) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID N° : 7 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

(A) LONGUEUR : 21 nucléotides

(B) TYPE : ADN

(C) NOMBRE DE BRINS : 1

(ii) ANTI-SENS : OUI

(iii) CARACTERISTIQUE : LIAISON AU GENE TAR DU VIH

(iv) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID N° : 7 :

TCCCAGAGGCCGCTGCAATGT

(9) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID N° : 8 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

(A) LONGUEUR : 21 nucléotides

(B) TYPE : ADN

(C) NOMBRE DE BRINS : 1

(ii) ANTI-SENS : OUI

(iii) CARACTERISTIQUE : LIAISON AU GENE TAR DU VIH

(iv) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID N° : 8 :

TCCCAGAATGGTGTGCTCCG

(10) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID N° : 9 :

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR : 21 nucléotides
 - (B) TYPE : ADN
 - (C) NOMBRE DE BRINS : 1

- (ii) ANTI-SENS : OUI

- (iii) CARACTERISTIQUE : LIAISON AU GENE TAR DU VIH

- (iv) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID N° : 9 :

TCCCAGGAGTGTC AATCGGGT

(11) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID N° : 10 :

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR : 21 nucléotides
 - (B) TYPE : ADN
 - (C) NOMBRE DE BRINS : 1

- (ii) ANTI-SENS : OUI

- (iii) CARACTERISTIQUE : LIAISON AU GENE TAR DU VIH

- (iv) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID N° : 10 :

TCCCAGGATGTCATAACACCT

(12) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID N° : 11 :

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR : 21 nucléotides
 - (B) TYPE : ADN
 - (C) NOMBRE DE BRINS : 1

- (ii) ANTI-SENS : OUI

- (iii) CARACTERISTIQUE : LIAISON AU GENE TAR DU VIH

- (iv) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID N° : 11 :

TCCCAGTTTCCGAATGGCGGT

(13) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID N° : 12 :

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR : 21 nucléotides
 - (B) TYPE : ADN
 - (C) NOMBRE DE BRINS : 1

- (ii) ANTI-SENS : OUI

(iii) CARACTERISTIQUE : LIAISON AU GENE TAR DU VIH

(iv) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID N° : 12 :

TCCCAGTTCGTCTTGGTTCGT

(14) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID N° : 13 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

(A) LONGUEUR : 21 nucléotides

(B) TYPE : ADN

(C) NOMBRE DE BRINS : 1

(ii) ANTI-SENS : OUI

(iii) CARACTERISTIQUE : LIAISON AU GENE TAR DU VIH

(iv) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID N° : 13 :

TGGGATATCCAGCTGTCCCAG

(15) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID N° : 14 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

(A) LONGUEUR : 21 nucléotides

(B) TYPE : ADN

(C) NOMBRE DE BRINS : 1

(ii) ANTI-SENS : OUI

(iii) CARACTERISTIQUE : LIAISON AU GENE TAR DU VIH

(iv) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID N° : 14 :

TGGGATATCGAGCGCTCCCAG

(16) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID N° : 15 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

(A) LONGUEUR : 21 nucléotides

(B) TYPE : ADN

(C) NOMBRE DE BRINS : 1

(ii) ANTI-SENS : OUI

(iii) CARACTERISTIQUE : LIAISON AU GENE TAR DU VIH

(iv) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID N° : 15 :

TCAATGTGCCAATGCTCCCAG

(17) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID N° : 16 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

- (A) LONGUEUR : 21 nucléotides
- (B) TYPE : ADN
- (C) NOMBRE DE BRINS : 1

(ii) ANTI-SENS : OUI

(iii) CARACTERISTIQUE : LIAISON AU GENE TAR DU VIH

(iv) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID N° : 16 :

CGGACAGCGCCTTCTTCCCAG

(18) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID N° : 17 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

- (A) LONGUEUR : 21 nucléotides
- (B) TYPE : ADN
- (C) NOMBRE DE BRINS : 1

(ii) ANTI-SENS : OUI

(iii) CARACTERISTIQUE : LIAISON AU GENE TAR DU VIH

(iv) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID N° : 17 :

GTGGCAGAAGCTCTTCCCAG

(19) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID N° : 18 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

- (A) LONGUEUR : 21 nucléotides
- (B) TYPE : ADN
- (C) NOMBRE DE BRINS : 1

(ii) ANTI-SENS : OUI

(iii) CARACTERISTIQUE : LIAISON AU GENE TAR DU VIH

(iv) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID N° : 18 :

GGCAATTCGATGTCATCCCAG

(20) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID N° : 19 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

- (A) LONGUEUR : 21 nucléotides
- (B) TYPE : ADN
- (C) NOMBRE DE BRINS : 1

(ii) ANTI-SENS : OUI

(iii) CARACTERISTIQUE : LIAISON AU GENE TAR DU VIH

(iv) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID N° : 19 :

TGGGTGGTTGGGTCTCCAG

(21) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID N° : 20 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

(A) LONGUEUR : 21 nucléotides

(B) TYPE : ADN

(C) NOMBRE DE BRINS : 1

(ii) ANTI-SENS : OUI

(iii) CARACTERISTIQUE : LIAISON AU GENE TAR DU VIH

(iv) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID N° : 20 :

AGGTGCTTGGAGCCGTAACCA

(22) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID N° : 21 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

(A) LONGUEUR : 21 nucléotides

(B) TYPE : ADN

(C) NOMBRE DE BRINS : 1

(ii) ANTI-SENS : OUI

(iii) CARACTERISTIQUE : LIAISON AU GENE TAR DU VIH

(iv) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID N° : 21 :

AGGTGCTTGGAGCCGTAACCA

(23) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID N° : 22 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

(A) LONGUEUR : 21 nucléotides

(B) TYPE : ADN

(C) NOMBRE DE BRINS : 1

(ii) ANTI-SENS : OUI

(iii) CARACTERISTIQUE : LIAISON AU GENE TAR DU VIH

(iv) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID N° : 22 :

AGGTGCTTGGAGCCGTAACCA

(24) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID N° : 23 :

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR : 21 nucléotides
 - (B) TYPE : ADN
 - (C) NOMBRE DE BRINS : 1

- (ii) ANTI-SENS : OUI

- (iii) CARACTERISTIQUE : LIAISON AU GENE TAR DU VIH

- (iv) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID N° : 23 :

TCTAACGCCGCATCGGGGTCG

(25) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID N° : 24 :

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR : 21 nucléotides
 - (B) TYPE : ADN
 - (C) NOMBRE DE BRINS : 1

- (ii) ANTI-SENS : OUI

- (iii) CARACTERISTIQUE : LIAISON AU GENE TAR DU VIH

- (iv) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID N° : 24 :

TCTAACTTTGGCGGGTCTCTC

(26) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID N° : 25 :

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR : 21 nucléotides
 - (B) TYPE : ADN
 - (C) NOMBRE DE BRINS : 1

- (ii) ANTI-SENS : OUI

- (iii) CARACTERISTIQUE : LIAISON AU GENE TAR DU VIH

- (iv) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID N° : 25 :

TCTAACGGTGCGGGGTGTCC

(27) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID N° : 26 :

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR : 21 nucléotides
 - (B) TYPE : ADN
 - (C) NOMBRE DE BRINS : 1

- (ii) ANTI-SENS : OUI

(iii) CARACTERISTIQUE : LIAISON AU GENE TAR DU VIH

(iv) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID N° : 26 :

TCTAACGAACTTCGGTTTCA

(28) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID N° : 27 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

(A) LONGUEUR : 21 nucléotides

(B) TYPE : ADN

(C) NOMBRE DE BRINS : 1

(ii) ANTI-SENS : OUI

(iii) CARACTERISTIQUE : LIAISON AU GENE TAR DU VIH

(iv) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID N° : 27 :

TCTAACTTTGGCGGGTCTCTG

(29) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID N° : 28 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

(A) LONGUEUR : 21 nucléotides

(B) TYPE : ADN

(C) NOMBRE DE BRINS : 1

(ii) ANTI-SENS : OUI

(iii) CARACTERISTIQUE : LIAISON AU GENE TAR DU VIH

(iv) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID N° : 28 :

TCTAACGGGTGCCTACTCGTT

REVENDICATIONS

1. Oligonucléotide Aptastruc caractérisé en ce qu'il présente une
5 affinité pour une séquence cible d'acide nucléique ADN ou ARN à structure non linéaire, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence de bases nucléiques qui ne permet pas une interaction canonique avec la séquence cible et qu'il forme un complexe avec ladite séquence cible.
- 10 2. Oligonucléotide selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il présente une affinité pour une séquence cible d'ADN ou d'ARN comportant un fragment simple brin à structure linéaire adjacent à une structure non linéaire, et il comporte une séquence complémentaire d'une
15 partie dudit fragment simple brin linéaire de la cible et le reste de la séquence de l'oligonucléotide constituant sa majeure partie, ne permet pas une interaction canonique avec la séquence cible.
3. Oligonucléotide selon la revendication 2, caractérisé en ce qu'il
20 forme un complexe avec la séquence cible plus stable que le complexe formé par un oligonucléotide constitué par la seule séquence complémentaire dudit fragment simple brin à structure linéaire, avec la même séquence cible.
4. Oligonucléotide selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé
25 en ce que la séquence cible présente une structure auto-appariée en épingle à cheveux prolongée par une région simple brin non appariée et la séquence de l'oligonucléotide Aptastruc est pour partie complémentaire de la séquence de ladite région simple brin.
- 30 5. Oligonucléotide selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'il comporte de 15 à 50 nucléotides.
6. Oligonucléotide selon l'une des revendications 2 à 5, caractérisé
35 en ce qu'il comporte un fragment de 0 à 10 nucléotides de séquences complémentaires à une région simple brin de la séquence cible, couplé à un fragment de 10 à 35 nucléotides non complémentaires de la séquence primaire de la séquence cible.

7. Oligonucléotide selon l'une des revendications 1 à 6 caractérisé en ce que la séquence cible est une séquence à structure non linéaire d'un acide nucléique ADN ou ARN qui commande l'expression d'un gène appliqué dans une pathologie humaine ou animale.

5

8. Oligonucléotide selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce qu'il permet le blocage du développement d'un virus, d'une bactérie ou d'un parasite.

10

9. A titre de médicament un oligonucléotide selon l'une des revendications 1 à 8:

15

10. Procédé de préparation par sélection *in vitro* d'un oligonucléotide selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que :

a) on prépare une population d'oligonucléotides candidats de séquences aléatoires,

20

b) on met cette population d'oligonucléotides candidats en présence de la séquence cible, les candidats étant en excès par rapport à la séquence cible, et

c) on isole les oligonucléotides qui forment un complexe stable avec la séquence cible, et

d) on amplifie les échantillons d'acide nucléique obtenu à l'étape c),

25

e) on réitère plusieurs fois les étapes b) et c), en particulier de 1 à 30 fois,

11. Procédé de préparation d'un oligonucléotide selon la revendication 10, caractérisé en ce que :

30

a) on prépare une population d'oligonucléotides candidats présentant de 5' en 3' :

- une séquence correspondant à un premier site de restriction ;
- un premier fragment de séquences complémentaires d'une partie d'un fragment simple brin à structure linéaire de la séquence cible ;
- un second fragment de séquences aléatoires, et

35

- une séquence correspondant à un deuxième site de restriction,

b) on met cette population d'oligonucléotides candidats en présence de la séquence cible, et d'un oligonucléotide sélecteur, ledit oligonucléotide sélecteur étant complémentaire à une partie dudit premier
5 fragment, les oligonucléotides candidats et sélecteurs étant en excès par rapport à la cible.

c) on soumet l'échantillon d'acide nucléique obtenu à l'étape b) à une étape de digestion par une enzyme ayant pour substrat le complexe d'hybridation formé par l'oligonucléotide sélecteur et la partie dudit
10 premier brin dont il est complémentaire, de sorte que les candidats ayant une affinité pour la séquence cible restent intacts et les autres après association au sélecteur sont coupés.

d) on ajoute des amorces 1 et 2 complémentaires respectivement des extrémités 3' et 5' des oligonucléotides candidats, lesdites extrémités
15 correspondant auxdits premier et deuxième sites de restriction.

e) on effectue une amplification enzymatique de l'ADN de l'échantillon.

f) on réitère éventuellement les étapes b) à e) plusieurs fois, notamment de 1 à 30 fois, et

20 g) on isole un oligonucléotide parmi ceux obtenus à l'étape f).

1 / 5

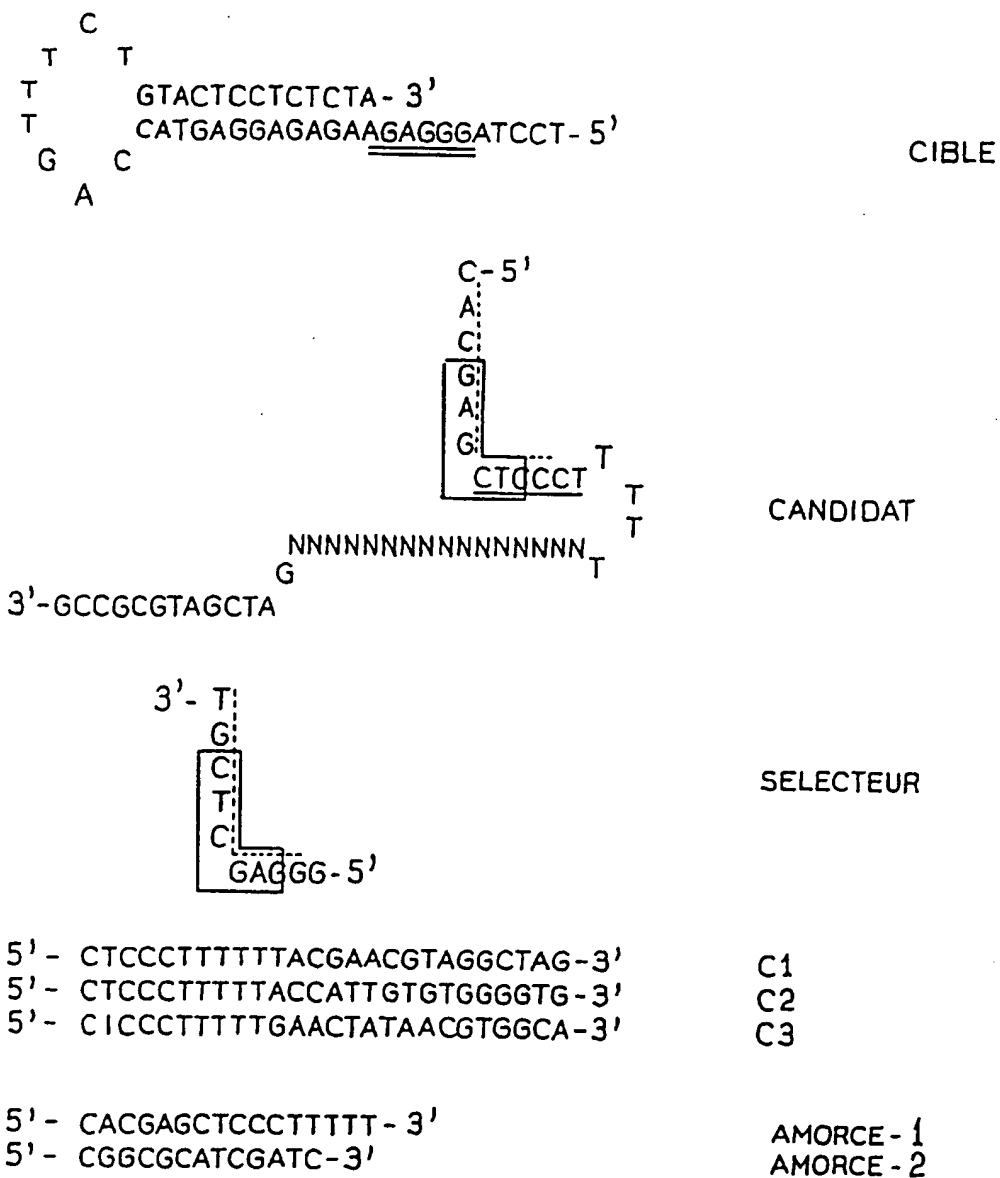
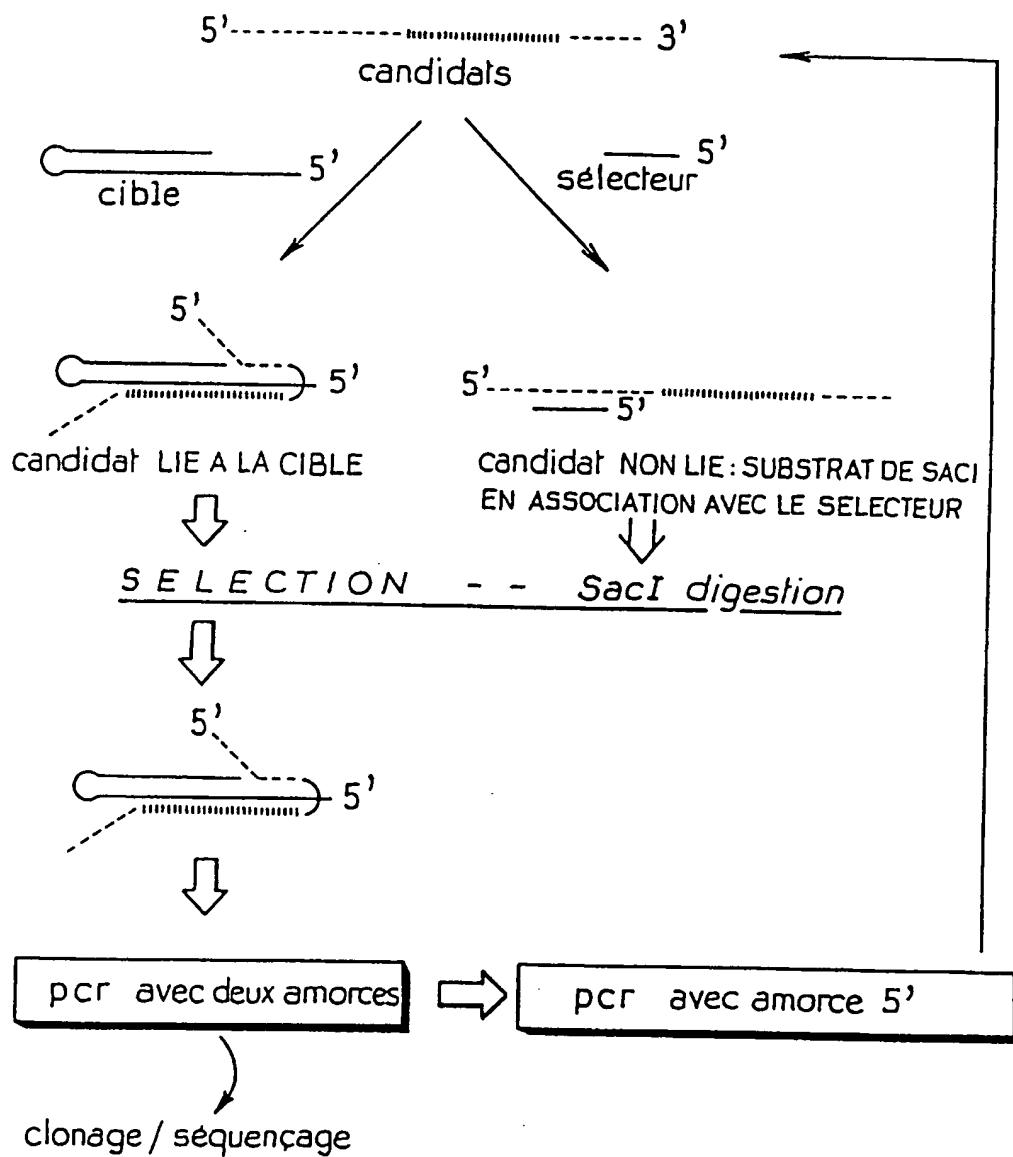


FIG. 1

2 / 5

FIG. 2

3 / 5

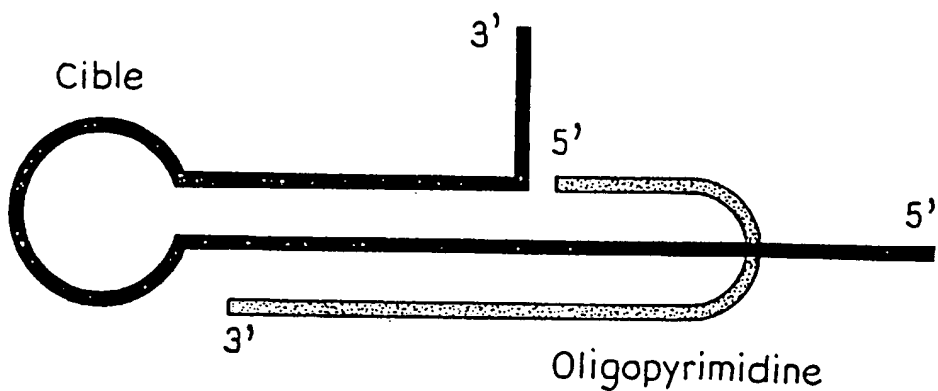


Schéma 1

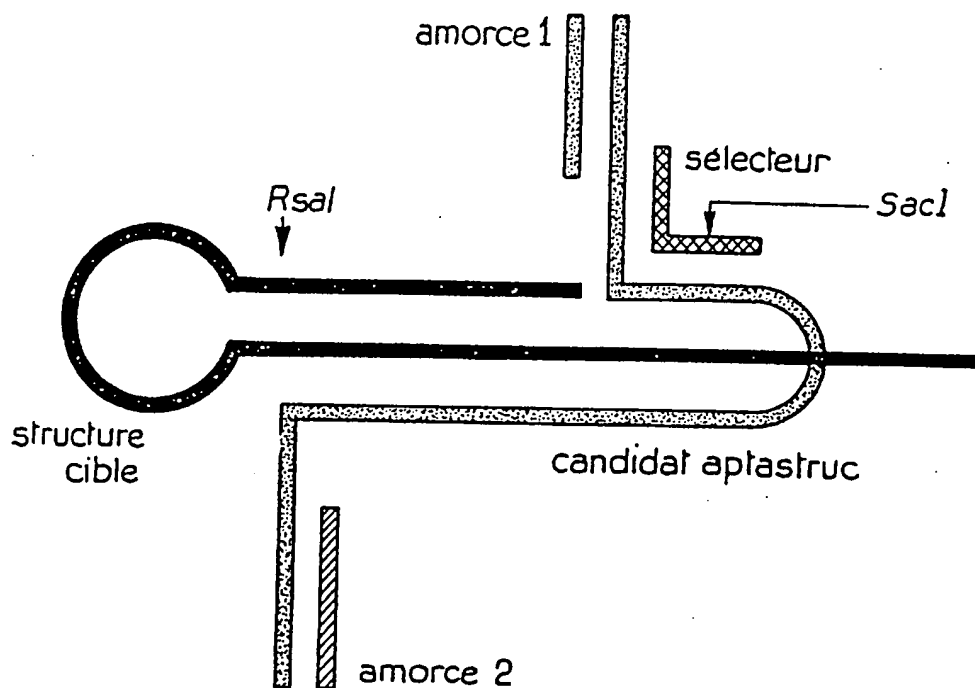


Schéma 2

FIG. 3

4 / 5

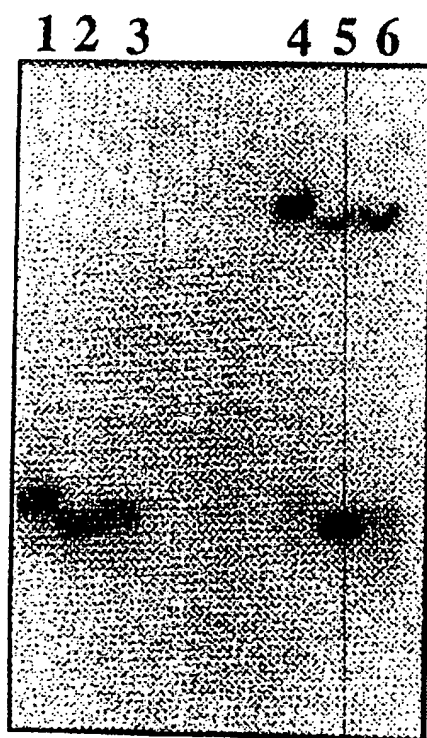
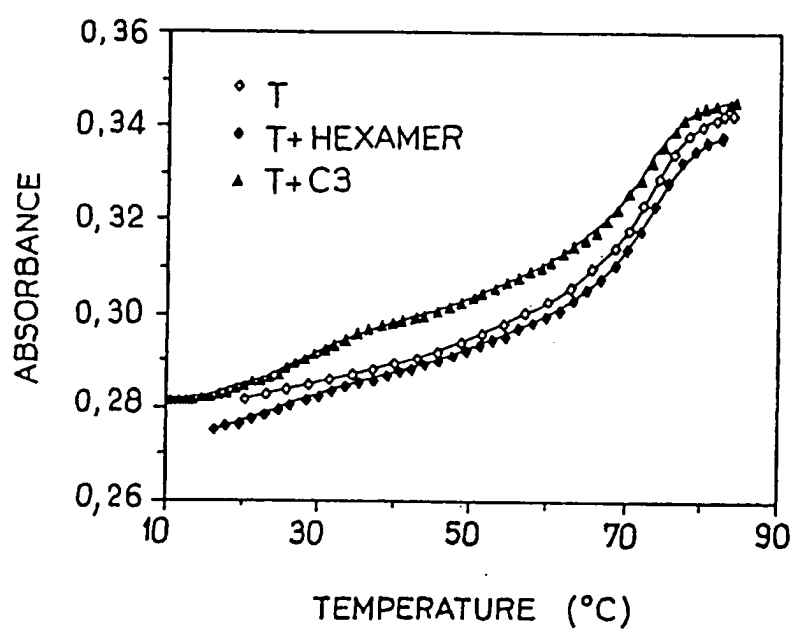


FIG. 4

5 / 5

FIG. 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No
 PCT/FR 95/01036

 A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC 6 C12N15/11 C12Q1/68 A61K31/70 C07H21/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N A61K C12Q C07H

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	NUCLEIC ACIDS RESEARCH 21 (24). 5616-5622, BROSSALINA, E. ET AL. 'The binding of an antisense oligonucleotide to a hairpin structure via triplex formation inhibits chemical and biological reactions.'	1-6
Y	see the whole document	7-11
X	J AM CHEM SOC 115 (2). 796-797, BROSSALINA, E. ET AL. 'A DNA HAIRPIN AS A TARGET FOR ANTISENSE OLIGONUCLEOTIDES.'	1-6
	cited in the application	
	see the whole document	
X	WO,A,91 17246 (ISIS PHARMACEUTICALS INC) 14 November 1991	1,7-9
Y	see page 5, line 18 - page 6	7-11
	see page 12, line 11 - page 13, line 29	
	see examples	

	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

10 January 1996

Date of mailing of the international search report

19.01.96

Name and mailing address of the ISA

 European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Andres, S

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/FR 95/01036

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO,A,92 01806 (PUBLIC HEALTH RESEARCH INST. OF THE CITY OF NEW YORK) 6 February 1992 see page 8, line 17 - page 10, line 10 see example 4 ---	1,7-10
A	SCIENCE, vol. 249, 3 August 1990 LANCASTER, PA US, page 505-10 TUERK, C. & GOLD, L. 'Systemic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase' cited in the application see figure 2 ---	10,11
P,X	COMPTES RENDUS DES SEANCES DE L'ACADEMIE DES SCIENCES SERIE III: SCIENCES DE LA VIE., vol. 317, November 1994 MONTREUIL FR, pages 977-982, MISHRA, R. & TOULME, J.-J. 'In vitro selection of oligonucleotides targeted to a hairpin structure' see the whole document -----	1-8,10, 11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information - patent family members

International Application No

PCT/FR 95/01036

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9117246	14-11-91	AU-B- 654816	24-11-94
		AU-B- 7775391	27-11-91
		EP-A- 0529008	03-03-93
		JP-T- 5503633	17-06-93

WO-A-9201806	06-02-92	AU-B- 651380	21-07-94
		AU-B- 8517591	18-02-92
		EP-A- 0600877	15-06-94

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

FR/95/01036

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. Claims 1-9
"Aptastruc" oligonucleotides capable of binding to a nucleic acid with a non-linear structure and medicament containing them.
2. Claims 10-11:
Method of preparing these oligonucleotides by *in vitro* selection.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No
PCT/FR 95/01036

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE CIB 6 C12N15/11 C12Q1/68 A61K31/70 C07H21/00		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 6 C12N A61K C12Q C07H		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	NUCLEIC ACIDS RESEARCH 21 (24). 5616-5622, BROSSALINA, E. ET AL. 'The binding of an antisense oligonucleotide to a hairpin structure via triplex formation inhibits chemical and biological reactions.' voir le document en entier	1-6
Y	---	7-11
X	J AM CHEM SOC 115 (2). 796-797, BROSSALINA, E. ET AL. 'A DNA HAIRPIN AS A TARGET FOR ANTISENSE OLIGONUCLEOTIDES.' cité dans la demande voir le document en entier	1-6
X	---	---
Y	WO,A,91 17246 (ISIS PHARMACEUTICALS INC) 14 Novembre 1991 voir page 5, ligne 18 - page 6 voir page 12, ligne 11 - page 13, ligne 29 voir exemples	1,7-9
Y	---	7-11

-/--		
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe </div>		
* Catégories spéciales de documents cités: <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>*A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>*E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>*L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>*O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>*P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>*T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>*X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément</p> <p>*Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier</p> <p>*Z* document qui fait partie de la même famille de brevets</p> </div> </div>		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée <div style="text-align: center; font-weight: bold;">10 Janvier 1996</div>		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale <div style="text-align: center; font-weight: bold;">19.01.96</div>
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tél. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+ 31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé <div style="text-align: center; font-weight: bold;">Andres, S</div>

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande International No
PCT/FR 95/01036

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO,A,92 01806 (PUBLIC HEALTH RESEARCH INST. OF THE CITY OF NEW YORK) 6 Février 1992 voir page 8, ligne 17 - page 10, ligne 10 voir exemple 4 ---	1,7-10
A	SCIENCE, vol. 249, 3 Août 1990 LANCASTER, PA US, page 505-10 TUERK, C. & GOLD, L. 'Systemic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase' cité dans la demande voir figure 2 ---	10,11
P,X	COMPTES RENDUS DES SEANCES DE L'ACADEMIE DES SCIENCES SERIE III: SCIENCES DE LA VIE., vol. 317, Novembre 1994 MONTREUIL FR, pages 977-982, MISHRA, R. & TOULME, J.-J. 'In vitro selection of oligonucleotides targeted to a hairpin structure' voir le document en entier -----	1-8,10, 11

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de la famille de brevets

Demande Internationale No

PCT/FR 95/01036

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)		Date de publication
WO-A-9117246	14-11-91	AU-B-	654816	24-11-94
		AU-B-	7775391	27-11-91
		EP-A-	0529008	03-03-93
		JP-T-	5503633	17-06-93
WO-A-9201806	06-02-92	AU-B-	651380	21-07-94
		AU-B-	8517591	18-02-92
		EP-A-	0600877	15-06-94

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR95/01036

Cadre I Observations - lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 1 de la première feuille)

Conformément à l'article 17.2)a), certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:

1. ☐ Les revendications n°
se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir:
2. ☐ Les revendications n°
se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier:
3. ☐ Les revendications n°
sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).

Cadre II Observations - lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 2 de la première feuille)

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

1. Revendications 1-9:
Oligonucléotides 'aptastruc' capables de se lier à un acide nucléique ayant une structure non-linéaire et médicament les contenant.
2. Revendications 10-11:
Méthode de préparation de ces oligonucléotides par sélection in vitro

1. ☐ Comme toutes les taxes additionnelles ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.
2. ☒ Comme toutes les recherches portant sur les revendications qui s'y prétaient ont pu être effectuées sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration n'a sollicité le paiement d'aucune taxe de cette nature.
3. ☐ Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n°:
4. ☐ Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couverte par les revendications n°:

Remarque quant à la réserve

- ☐ Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant.
- ☐ Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.

RAISONS POUR L'OBJECTION DE NON-UNITÉ

Le problème que se propose de résoudre la demande telle que déposée, est considéré comme étant l'élaboration d'oligonucléotides capables de se lier à des acides nucléiques cible pouvant adopter une structure tertiaire.

La solution proposée dans la demande est l'élaboration d'oligonucléotides antisens capables de former une double épingle à cheveux avec une cible ayant une structure non-linéaire. De plus, la demande décrit une méthode de préparation de ces oligonucléotides par sélection *in vitro*.

Néanmoins, des solutions basées sur des caractéristiques techniques identiques ou correspondantes à celles proposées dans la demande ont déjà été décrites:

* JACS 115 (1993), 796-7 décrit un oligonucléotide capable de se lier à une cible ayant une structure tertiaire sans interférer avec celle-ci. Cet oligonucléotide se lie en formant une double épingle à cheveux avec la structure tertiaire de la cible. L'article décrit aussi la préparation d'un tel oligonucléotide.

Donc, le concept d'utiliser des oligonucléotides antisens capables de former une double épingle à cheveux avec une cible ayant une structure non-linéaire, était déjà connu. De même, une méthode pour la préparation de tels oligonucléotides était, elle aussi, déjà disponible dans l'art antérieur.

De ce fait, les oligonucléotides proposés dans la présente demande ne peuvent être acceptés comme étant la caractéristique technique particulière qui relierait les oligonucléotides *per se* et la méthode de préparation, qui doit être considéré comme une solution alternative à un problème connu. Comme aucun autre lien technique, qui remplirait cette condition, ne peut être trouvé dans la demande, il n'y pas de concept inventif commun entre les différentes inventions revendiquées, et une objection de non-unité d'inventions *a posteriori* doit être soulevée conformément à l'article 13.1 PCT.